

林学基础研究系列



白桦基因工程育种

刘桂丰 李慧玉 黄海娇 著
杨传平 主审



科学出版社

白桦基因工程育种

刘桂丰 李慧玉 黄海娇 著

杨传平 主审

科学出版社

北京

内 容 简 介

本书汇集了著者近十年来在白桦基因工程育种方面的研究成果,共分三篇,介绍了白桦转基因株系的生长、生殖、生理和材性特征,以及目标基因的表达特性,选择了白桦转基因优良株系。第一篇白桦抗旱耐盐基因工程育种共4章,包括:第1章转 *BpTCP7* 基因白桦抗旱耐盐性研究,第2章转 *BpSPL9* 基因白桦抗旱耐盐性研究,第3章转 *BpCHS3* 基因白桦耐盐性研究,第4章转 *ThDHN* 基因白桦抗旱耐盐性分析。第二篇白桦材性改良基因工程育种,包括:第5章白桦 *BpCCR1* 基因的功能分析。第三篇白桦生长发育相关基因工程育种共7章,包括:第6章白桦 *BpIAA10* 基因的功能研究,第7章白桦 *BpGH3.5* 基因的功能研究,第8章白桦 *BpPIN* 基因的功能研究,第9章白桦 *BpCUC2* 基因的功能研究,第10章白桦 *BpCUC2a* 基因的功能研究,第11章白桦 *BpTOPP1* 基因的功能研究,第12章白桦 *BpAPI* 基因的功能研究。

本书可以作为农学、林学专业本科生及研究生的辅助教材,也可以作为农学、林学等领域教学人员、科研和管理人员的参考书。

图书在版编目(CIP)数据

白桦基因工程育种/刘桂丰,李慧玉,黄海娇著. —北京:科学出版社, 2019.6

ISBN 978-7-03-060033-2

I. ①白… II. ①刘… ②李… ③黄… III. ①白桦—遗传育种—文集
IV. ①S792.153.04-53

中国版本图书馆CIP数据核字(2018)第280976号

责任编辑:张会格 刘 晶 / 责任校对:郑金红

责任印制:吴兆东 / 封面设计:刘新新

科 学 出 版 社 出 版

北京东黄城根北街16号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

北京建宏印刷有限公司印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2019年6月第 一 版 开本: B5 (720×1000)

2019年6月第一次印刷 印张: 20 1/4

字数: 400 000

定价: 198.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换)

前 言

白桦 (*Betula platyphylla* Suk.) 是桦木属 (*Betula* Linn.) 的一种。白桦是重要的珍贵阔叶树种之一,在我国东北地区,白桦分布面积最广,占全国桦木类的 87%。白桦适应性强,天然更新快,为采伐迹地或火烧迹地更新的先锋树种。白桦地理分布范围很广,在我国东北阔叶树中的蓄积量最大,另外在华北、西北、西南地区的高海拔山地也有连续分布。

白桦是落叶乔木,材质具有纹理细致、颜色洁白、表面光滑度高等独有特点。大径级白桦是单板、胶合板生产加工原料的首选材料,同时又可做工艺材、家具材、纸浆材,特别是航空胶合板不可代替的树种。统计资料表明,我国胶合板产量为 260.62 万 m^3 ,每年消耗大量的大径级原木。然而目前传统的胶合板原料树种如椴树、水曲柳资源已近枯竭,其他符合单板加工原料要求的原木也为数甚少,难以满足要求。过去我国对白桦的价值认识不够,因此一直认为其是林分改造的伐除对象。如今,随着森林资源的枯竭,白桦的利用价值和经济价值已被人们广泛认同,对白桦的木材需要量逐年增加,价格一涨再涨,现在市场价格已与柞木相同。

1990 年以前,在“大林业”思想的影响下,白桦的地位和作用在我国并不被人们所重视,这直接导致了原有白桦资源的巨大浪费和种质资源的严重退化。自 1990 年起,白桦的地位和作用逐渐被人们所重视,我国相继开展了白桦各方面的研究工作。在白桦种质资源保护及区划的基础上,开展了白桦的种源试验、优树选择、强化育种、杂交育种、倍性育种,以及生殖生物学、分子生物学、生理生化和分子育种等方面的研究工作,目的是选择或培育生长快、材质好、抗性强的优良群体或优良类型(优良品种)。

基因工程是现代生物技术的核心内容,在植物育种中将发挥越来越大的作用。林木常规育种受树木生长周期长的限制,性状的基因背景分析非常复杂,增加了育种工作的难度。基因工程育种具有目的性强、时间短的特点,并可以打破种间杂交不亲和的界限,加速林木新品种的培育,已成为高新技术育种的核心技术。

2009 年至今,著者所在团队在白桦抗逆、材性及生长发育相关基因工程育种方面做了大量的工作:克隆了 13 条基因,构建了过表达及抑制表达载体 18 个,获得 170 余个转基因株系,对转基因株系的表型、生理及基因调控机制进行分析,鉴定出了优质、抗逆、早花及叶形变化的转基因株系。相关成果已发表论文 10 篇,

其中 SCI 论文 5 篇。基于此，本专著以 5 篇博士论文、14 篇硕士论文为基础，对白桦基因工程育种进行了总结。

本书共分为三篇。第一篇白桦抗旱耐盐基因工程育种共 4 章，包括：第 1 章转 *BpTCP7* 基因白桦的抗旱耐盐性研究，第 2 章转 *BpSPL9* 基因白桦的抗旱耐盐性研究，第 3 章转 *BpCHS3* 基因白桦的耐盐性研究，第 4 章转 *ThDHN* 基因白桦的抗旱耐盐性分析。第二篇白桦材性改良基因工程育种，包括：第 5 章白桦 *BpCCR1* 基因的功能分析。第三篇白桦生长发育相关基因工程育种共 7 章，包括：第 6 章白桦 *BpIAA10* 基因的功能研究，第 7 章白桦 *BpGH3.5* 基因的功能研究，第 8 章白桦 *BpPIN* 基因的功能研究，第 9 章白桦 *BpCUC2* 基因的功能研究，第 10 章白桦 *BpCUC2a* 基因的功能研究，第 11 章白桦 *BpTOPP1* 基因的功能研究，第 12 章白桦 *BpAP1* 基因的功能研究。本书重点研究了白桦转基因株系的生长、生殖、生理和材性特征，以及目标基因的表达特性。本书可以作为农学、林学专业本科生及研究生的辅助教材，也可以作为农学、林学等领域教学人员、科研和管理人员的参考书。

本书研究受“国家林业公益性行业科研专项项目(200904039)”“国家高技术研究发展计划课题(2013AA102704)”“国家自然科学基金项目(31370660)”“国家科技支撑计划课题(2012BAD21B00)”等的资助，特此致谢。在本书的编写过程中，杨传平教授审阅了全书并提出了宝贵意见，杨洋、宁坤、姜晶、王芳、张瑞萍、韦睿、张闻博、徐文娣、杨光、渠畅、徐焕文、刘超逸、邢宝月、陈晨、陈继英、王珊、黄海娇、王朔等进行了相关实验研究，在此一并致谢。

作者

2018年6月30日

目 录

前言

第一篇 白桦抗旱耐盐基因工程育种

第1章 转 <i>BpTCP7</i> 基因白桦的抗旱耐盐性研究	3
1.1 <i>BpTCP</i> 家族基因的生物信息学分析	3
1.1.1 <i>BpTCP</i> 基因的特性分析	3
1.1.2 蛋白质基本结构域的预测	3
1.1.3 <i>BpTCP</i> 基因氨基酸序列的同源性分析	4
1.1.4 <i>BpTCP</i> 基因系统进化树	5
1.2 <i>BpTCP</i> 基因在白桦不同组织器官表达特性	5
1.3 <i>BpTCP7</i> 基因启动子的表达特性	7
1.3.1 <i>BpTCP7</i> 基因启动子的克隆	7
1.3.2 <i>BpTCP7</i> 基因启动子顺式作用元件预测	7
1.3.3 <i>BpTCP7</i> 基因组织部位表达特性	10
1.3.4 <i>BpTCP7</i> 基因干旱及盐应答特性	11
1.4 <i>BpTCP7</i> 基因的白桦遗传转化研究	11
1.4.1 <i>BpTCP7</i> 基因植物过表达载体的构建	11
1.4.2 转基因白桦的获得	13
1.4.3 转基因株系的分子检测	14
1.5 转 <i>BpTCP7</i> 基因白桦的抗旱耐盐性分析	15
1.5.1 NaCl 胁迫处理及生理指标测定	15
1.5.2 PEG 胁迫处理及生理指标测定	16
第2章 转 <i>BpSPL9</i> 基因白桦的抗旱耐盐性研究	20
2.1 <i>BpSPL</i> 家族基因的生物信息学分析	20
2.1.1 白桦 <i>BpSPL</i> 基因的特性分析	20
2.1.2 白桦 <i>SPL</i> 基因的染色体定位分析	21
2.1.3 白桦 <i>BpSPL</i> 基因氨基酸序列的同源性分析	21

2.1.4	<i>BpSPL</i> 基因的系统发育分析	23
2.2	<i>BpSPL</i> 基因在白桦不同组织器官表达特性	24
2.2.1	<i>BpSPL</i> 基因组织部位表达特性	24
2.2.2	NaCl 和 PEG 胁迫下 <i>BpSPL9</i> 的应答特性	25
2.3	<i>BpSPL9</i> 基因在白桦遗传转化研究	26
2.3.1	植物过表达载体的构建	26
2.3.2	转基因白桦的获得	29
2.3.3	转基因株系的分子检测	29
2.4	转 <i>BpSPL9</i> 基因白桦的抗旱耐盐性分析	31
2.4.1	转基因植株的耐盐性分析	31
2.4.2	转基因植株的抗旱性分析	35
第 3 章	转 <i>BpCHS3</i> 基因白桦的耐盐性研究	41
3.1	<i>BpCHS3</i> 基因生物信息学分析	41
3.1.1	<i>BpCHS3</i> 基因开放读码框和相似性比对	41
3.1.2	<i>BpCHS3</i> 氨基酸序列及理化性质	41
3.1.3	<i>BpCHS3</i> 基因系统进化树	43
3.2	<i>BpCHS3</i> 基因在白桦遗传转化研究	44
3.2.1	植物表达载体的构建	44
3.2.2	<i>BpCHS3</i> 基因过表达株系的获得	47
3.2.3	白桦 <i>BpCHS3</i> 基因干扰株系的获得	49
3.3	转 <i>BpCHS3</i> 基因白桦的耐盐性分析	51
3.3.1	转基因白桦组培苗的耐盐性分析	51
3.3.2	田间盆栽转基因白桦的耐盐性分析	52
3.4	转 <i>BpCHS3</i> 基因白桦的叶片花青素含量比较	53
第 4 章	转 <i>ThDHN</i> 基因白桦的抗旱耐盐性分析	55
4.1	<i>ThDHN</i> 基因的生物信息学分析	55
4.2	<i>ThDHN</i> 基因在不同逆境下的表达分析	59
4.2.1	盐胁迫处理下 <i>ThDHN</i> 基因在怪柳中的表达	59
4.2.2	干旱胁迫处理下 <i>ThDHN</i> 基因在怪柳中的表达	59
4.2.3	冷胁迫处理下 <i>ThDHN</i> 基因在怪柳中的表达	60
4.2.4	重金属镉胁迫处理下 <i>ThDHN</i> 基因在怪柳中的表达	61
4.2.5	ABA 诱导处理下 <i>ThDHN</i> 基因在怪柳中的表达	61
4.3	<i>ThDHN</i> 基因在白桦遗传转化研究	62

4.3.1	<i>ThDHN</i> 基因植物过表达载体构建	62
4.3.2	转基因植株的获得	63
4.3.3	转基因株系的分子检测	63
4.4	转 <i>ThDHN</i> 基因白桦的抗旱耐盐性分析	65
4.4.1	转基因白桦耐盐性分析	65
4.4.2	转基因白桦的抗旱性分析	67

第二篇 白桦材性改良基因工程育种

第 5 章	白桦 <i>BpCCR1</i> 基因的功能分析	71
5.1	<i>BpCCR1</i> 基因的生物信息学分析	71
5.1.1	<i>BpCCR1</i> 基因序列相似性比对分析	71
5.1.2	<i>BpCCR1</i> 基因的氨基酸序列及理化性质	71
5.1.3	<i>BpCCR1</i> 基因系统进化树	73
5.2	<i>BpCCR1</i> 基因的白桦遗传转化研究	74
5.2.1	植物表达载体构建	74
5.2.2	转基因白桦的获得	76
5.2.3	转基因株系的分子检测	77
5.3	转 <i>BpCCR1</i> 基因白桦的生长特性及木质素含量测定	79
5.3.1	转基因白桦的生长特性	79
5.3.2	转基因白桦的木质素含量和综纤维素含量分析	82
5.3.3	转基因白桦的次生木质部结构观察	83
5.4	转 <i>BpCCR1</i> 基因白桦的转录组分析	86
5.4.1	RNA 质量检测	86
5.4.2	Illumina/Solexa 测序质量统计	87
5.4.3	Unigene 注释分析	88
5.4.4	转基因白桦 Unigene 的差异表达	90
5.4.5	差异基因的功能分类分析	90
5.4.6	差异基因的 Pathway 富集分析	92

第三篇 白桦生长发育相关基因工程育种

第 6 章	白桦 <i>BpIAA10</i> 基因的功能研究	101
6.1	<i>BpAux/IAA</i> 家族基因的生物信息学分析	101
6.1.1	<i>BpIAA</i> 家族基因序列分析	101

6.1.2	<i>BpIAA</i> 家族基因的染色体定位及基因结构分析	101
6.1.3	<i>BpIAA</i> 蛋白家族的结构及进化关系	104
6.2	<i>BpAux/IAA</i> 家族基因在白桦不同组织器官表达特性	106
6.2.1	不同倍性白桦中 20 条 <i>BpIAA</i> 基因的时序表达特性	106
6.2.2	四倍体白桦和二倍体白桦中内源激素 IAA 测定	107
6.3	<i>BpIAA10</i> 启动子功能研究	108
6.3.1	<i>BpIAA10</i> 启动子序列分析	108
6.3.2	<i>BpIAA10</i> 启动子克隆、载体构建及遗传转化	109
6.3.3	白桦 <i>BpIAA10</i> 基因启动子的表达特性	109
6.4	<i>BpIAA10</i> 基因在白桦遗传转化研究	113
6.4.1	<i>BpIAA10</i> 基因克隆及植物表达载体构建	113
6.4.2	白桦 <i>BpIAA10</i> 转录因子的亚细胞定位	115
6.4.3	转基因植株的获得	116
6.4.4	转基因株系的分子检测	117
6.5	<i>BpIAA10</i> 基因的功能研究	119
6.5.1	<i>BpIAA10</i> 基因影响白桦顶端幼叶的发育	119
6.5.2	<i>BpIAA10</i> 基因影响白桦休眠芽形成	126
6.5.3	<i>BpIAA10</i> 基因参与调控白桦不定根发育	132
6.5.4	<i>BpIAA10</i> 基因参与白桦气孔发育	134
6.5.5	<i>BpIAA10</i> 基因参与白桦高生长	134
6.5.6	<i>BpIAA10</i> 基因影响白桦功能叶基顶轴方向发育	136
6.6	酵母单杂交和酵母双杂交筛选 <i>BpIAA10</i> 启动子/ <i>BpIAA10</i> 转录因子的 互作蛋白	137
6.6.1	白桦 cDNA 文库的构建及质量检测	137
6.6.2	酵母单杂交筛选 <i>BpIAA10</i> 基因的上游调控因子	139
6.6.3	植物细胞中验证酵母单杂交筛选结果	141
6.6.4	<i>BpIAA10</i> 互作蛋白的筛选	142
6.6.5	双分子荧光互补 (BiFC) 在植物细胞内验证候选蛋白的互作	144
第 7 章	白桦 <i>BpGH3.5</i> 基因的功能研究	148
7.1	白桦 <i>BpGH3.5</i> 基因的生物信息学分析	148
7.2	<i>BpGH3.5</i> 基因在白桦不同组织器官表达特性	151
7.2.1	组织表达特异性分析	151

7.2.2	激素及非生物胁迫诱导表达分析	152
7.3	<i>BpGH3.5</i> 启动子的表达特性	152
7.3.1	<i>BpGH3.5</i> 启动子序列克隆	152
7.3.2	<i>BpGH3.5</i> 启动子序列分析	152
7.3.3	<i>BpGH3.5</i> 基因启动子驱动 GUS 的表达分析	154
7.4	<i>BpGH3.5</i> 基因的白桦遗传转化研究	155
7.4.1	植物过表达和抑制表达载体的构建	155
7.4.2	转基因植株的获得	156
7.4.3	转基因株系的分子检测	157
7.5	白桦 <i>GH3.5</i> 的功能研究	158
7.5.1	转基因白桦的苗高、地径调查	158
7.5.2	转基因白桦生长情况分析	159
7.5.3	转基因白桦的抗旱性分析	165
7.6	转 <i>GH3.5</i> 基因白桦的转录组分析	166
7.6.1	Illumina/Solexa 测序质量统计	166
7.6.2	Unigene 注释分析	166
7.6.3	差异 Unigene 的确定及功能分类	168
7.6.4	差异 Unigene 分析	172
7.6.5	RNA-seq 结果的验证	176
第 8 章	白桦 <i>BpPIN</i> 基因的功能研究	178
8.1	白桦 <i>BpPIN</i> 基因的生物信息学分析	178
8.1.1	构建 <i>BpPIN</i> 家族进化树	178
8.1.2	<i>BpPIN</i> 基因理化性质分析	178
8.1.3	保守结构域分析	181
8.1.4	跨膜结构域分析	181
8.2	<i>BpPIN</i> 基因在白桦不同组织器官表达特性	182
8.2.1	<i>BpPIN</i> 基因在白桦叶片不同组织部位中的表达特性	182
8.2.2	<i>BpPIN</i> 基因在白桦不同组织器官中的表达特性	183
8.2.3	IAA 含量与 <i>BpPIN</i> 表达的相关性分析	184
8.3	<i>BpPIN1</i> 、 <i>BpPIN3</i> 、 <i>BpPIN5</i> 启动子克隆及遗传转化	187
8.3.1	pro- <i>BpPIN</i> :: GUS 表达载体构建	187
8.3.2	转 <i>BpPIN</i> 启动子白桦的获得	189

8.3.3	转 <i>BpPIN</i> 启动子白桦的 GUS 染色	191
8.3.4	pro- <i>BpPIN3</i> :: GUS 白桦对 IAA 及 TIBA 的应答	191
8.4	<i>BpPIN3</i> 基因的白桦遗传转化研究	192
8.4.1	<i>BpPIN3</i> 基因的获得与分析	192
8.4.2	植物表达载体的获得	192
8.4.3	转基因植株的获得	195
8.4.4	转基因株系的分子检测	196
8.5	转 <i>PIN3</i> 基因白桦的功能分析	197
8.5.1	转基因白桦的苗高、地径比较	197
8.5.2	转基因白桦叶型指数比较	197
8.5.3	转基因白桦根生长特征比较	199
第 9 章	白桦 <i>BpCUC2</i> 基因的功能研究	201
9.1	<i>BpCUC2</i> 启动子的表达分析	201
9.1.1	<i>BpCUC2</i> 基因启动子的获得	201
9.1.2	Pro- <i>CUC2</i> :: LUC 载体的构建	201
9.1.3	转 Pro- <i>CUC2</i> :: LUC 白桦的获得及分子检测	202
9.1.4	Pro- <i>CUC2</i> 驱动的 LUC 表达特性	202
9.1.5	转 Pro- <i>CUC2</i> :: LUC 白桦对激素的应答分析	204
9.1.6	生长素响应元件的上游调控基因的获得	205
9.2	<i>BpCUC2</i> 基因的生物信息学分析	210
9.2.1	<i>BpCUC2</i> 基因的获得	210
9.2.2	<i>BpCUC2</i> 基因的生物信息学分析	210
9.3	<i>BpCUC2</i> 基因的白桦遗传转化研究	213
9.3.1	植物表达载体的构建	213
9.3.2	转基因植株的获得	215
9.3.3	转基因株系的分子检测	215
9.4	转 <i>BpCUC2</i> 基因白桦的功能研究	217
9.4.1	转 35S:: <i>BpCUC2</i> 白桦的苗高分析	217
9.4.2	转 35S:: <i>BpCUC2</i> 白桦的叶片数量分析	217
9.4.3	转 35S:: <i>BpCUC2</i> 白桦的节间距分析	218
第 10 章	白桦 <i>BpCUC2a</i> 基因的功能研究	221
10.1	白桦 <i>BpCUC2a</i> 基因的生物信息学分析	221

10.1.1	白桦 <i>BpCUC2a</i> 基因的获得	221
10.1.2	白桦 <i>BpCUC2a</i> 基因序列分析	222
10.1.3	<i>BpCUC2a</i> 蛋白二级结构预测	223
10.1.4	<i>BpCUC2a</i> 蛋白三级结构预测	224
10.1.5	<i>BpCUC2a</i> 基因的系统发育树	224
10.2	<i>BpCUC2at</i> 基因的白桦遗传转化研究	227
10.2.1	植株表达载体构建	227
10.2.2	转基因植株的获得	229
10.2.3	转基因株系的分子检测	230
10.3	转 <i>BpCUC2at</i> 基因白桦的功能分析	231
10.3.1	转基因白桦表型特征比较	231
10.3.2	转基因白桦苗高及节间数比较	232
10.3.3	转基因株系白桦叶表面特征及叶面积比较	235
10.4	转 <i>BpCUC2at</i> 基因白桦的内源 IAA 含量测定及相关基因表达	238
10.4.1	转基因白桦内源 IAA 含量测定	238
10.4.2	转基因白桦 IAA 运输及代谢相关基因表达特性分析	239
第 11 章	白桦 <i>BpTOPP1</i> 基因的功能研究	243
11.1	<i>BpTOPP</i> 基因的生物信息学分析	243
11.1.1	<i>BpTOPP</i> 与其他物种相似性比较及系统发育分析	243
11.1.2	<i>BpTOPP</i> 蛋白特性分析	244
11.2	<i>BpTOPP</i> 基因在白桦不同组织器官表达特性	246
11.2.1	白桦 <i>BpTOPP1</i> 基因的组织部位表达分析	246
11.2.2	白桦 <i>BpTOPP1</i> 基因的时序表达分析	247
11.2.3	白桦 <i>BpTOPP1</i> 基因家族的组织部位表达分析	247
11.2.4	白桦 <i>BpTOPP1</i> 基因家族的时序表达分析	250
11.3	<i>BpTOPP1</i> 基因的白桦遗传转化研究	252
11.3.1	植物表达载体的构建	252
11.3.2	转 35S:: <i>BpTOPP1</i> 植株的获得	254
11.3.3	转 35S:: anti- <i>BpTOPP1</i> 植株的获得	255
11.3.4	转基因株系的分子检测	255
11.4	转 <i>BpTOPP</i> 基因白桦的功能初探	259
11.4.1	转基因白桦的生长特性分析	259
11.4.2	转基因白桦的生理特性分析	261

11.4.3	转 <i>BpTOPPI</i> 基因白桦耐盐分析	264
第 12 章	白桦 <i>BpAPI</i> 基因的功能研究	269
12.1	<i>BpAPI</i> 基因的白桦遗传转化研究	269
12.1.1	<i>BpAPI</i> 基因 <i>ihpRNA</i> 表达载体构建	269
12.1.2	转基因植株的获得	269
12.1.3	转基因株系的分子检测	271
12.2	转 <i>BpAPI</i> 基因白桦的生长发育特性	272
12.2.1	<i>BpAPI</i> 基因过表达白桦的提早开花现象	272
12.2.2	<i>BpAPI</i> 基因过表达白桦雌、雄花的形态特征	272
12.2.3	<i>BpAPI</i> 基因过表达白桦 T0 代的高生长	275
12.2.4	转基因白桦 T1 代中 <i>BpAPI</i> 基因的遗传规律	276
12.2.5	<i>BpAPI</i> 基因抑制表达白桦的高生长	276
12.3	转 <i>BpAPI</i> 基因白桦的木材特性	278
12.3.1	转基因株系与非转基因株系的干性观测	278
12.3.2	转基因株系与非转基因株系木质素含量的比较	278
12.3.3	木材细胞壁的超微结构观察	279
12.4	转 <i>BpAPI</i> 基因白桦的转录组分析	280
12.4.1	Illumina 测序质量统计	280
12.4.2	转基因白桦和非转基因对照白桦 Unigene 的差异表达	281
12.4.3	差异基因的功能分类	283
12.4.4	差异 Unigene 的代谢途径	284
12.4.5	开花相关基因的差异表达	286
12.4.6	qRT-PCR 验证	289
12.5	白桦开花相关基因的表达特性分析	290
12.5.1	<i>BpAPI</i> 基因的组织部位表达特性	290
12.5.2	开花相关基因的时序表达特性	291
12.5.3	开花相关基因的表达相关性	296
12.6	<i>BpAPI</i> 靶基因的预测	296
12.6.1	<i>BpAPI</i> 靶基因的预测	296
12.6.2	<i>BpAPI</i> 及 2 个 MADS-box 下游靶基因的进化分析	297
12.6.3	<i>BpAPI</i> 与 <i>BpPI</i> 、 <i>BpAP3</i> 的表达相关性	298
12.6.4	<i>BpAPI</i> 和 <i>BpPI</i> 的组织表达特性分析	299
12.6.5	<i>BpAPI</i> 和 <i>BpPI</i> 在雌雄花序中的表达特性分析	300
	参考文献	303

第一篇

白桦抗旱耐盐基因工程育种

第 1 章 转 *BpTCP7* 基因白桦的抗旱耐盐性研究

TCP 转录因子参与叶片和花器官的发育、维管束后生木质部导管分子的分化和形成、下胚轴形成、顶端优势等生物过程，且参与细胞分裂素、茉莉酸甲酯、生长素和油菜素内酯等激素的合成途径及应答，在植物的生长发育过程中发挥着重要作用，非常有研究价值。本研究克隆了白桦的 *BpTCP* 基因，并对其进行生物信息学分析和表达模式分析，采用 $-\Delta\Delta Ct$ 法来确定白桦 *BpTCP* 家族 15 条基因在不同时间点、不同组织部位的相对表达量，分析该基因启动子的顺式作用元件，构建此启动子的植物表达载体并将其转化入拟南芥，研究该基因的组织部位表达情况，同时构建了 *BpTCP7* 的超表达植物表达载体并进行白桦的遗传转化，对超表达株系进行了盐、旱胁迫；酵母双杂交筛选出互作蛋白，为揭示 *BpTCP* 基因及其参与的调控路径提供理论依据，为转基因白桦的育种工作提供实践基础。

1.1 *BpTCP* 家族基因的生物信息学分析

根据白桦转录组测序结果进行数据分析，并结合 NCBI 上已有物种的 *TCP* 基因的比对结果，最终从转录组测序结果中找到 15 条白桦的 *TCP* 基因，依次命名为 *BpTCP1*~*BpTCP15*，其中 *BpTCP5* 为 3'端缺失序列，其余 14 条基因为全长序列。

1.1.1 *BpTCP* 基因的特性分析

白桦 *BpTCP* 基因的 ORF 长度范围为 804~1545bp，编码的氨基酸数目为 267~514，相对分子质量为 27.89~56.54kDa，理论等电点为 6.18~9.79。根据以上特性可知，各基因之间的特性存在差异，但变化范围不大，基因序列长度多集中在 800~1200bp（表 1-1）。

1.1.2 蛋白质基本结构域的预测

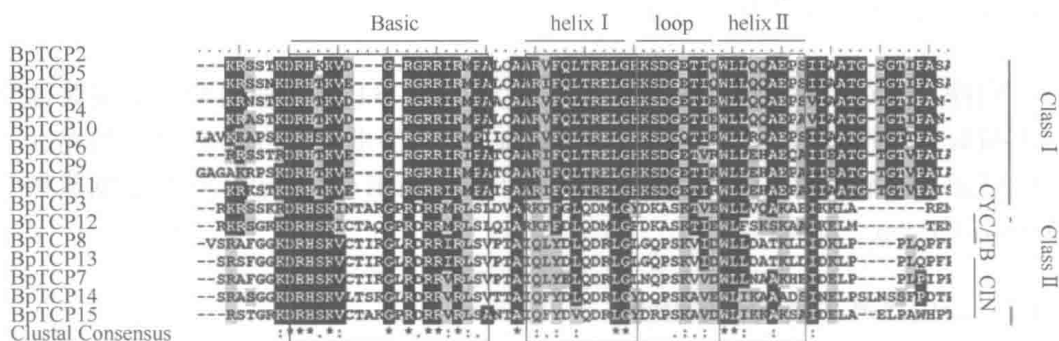
通过 NCBI 的 CDS (conserved domain search service) 工具预测 15 条白桦 *BpTCP* 基因的保守区，发现这 15 条白桦 *BpTCP* 基因均含有典型的 *TCP* 结构域。

表 1-1 白桦 *BpTCP* 基因特性分析

基因	5'UTR/bp	3'UTR/bp	ORF 长度/bp	氨基酸数目	相对分子质量/kDa	理论等电点(pI)
<i>BpTCP1</i>	52	610	1182	393	41.62	7.88
<i>BpTCP2</i>	231	353	804	267	28.41	8.71
<i>BpTCP3</i>	20	179	885	294	33.29	9.38
<i>BpTCP4</i>	285	151	1161	386	40.84	6.87
<i>BpTCP5</i>	387		873	291	31.10	9.27
<i>BpTCP6</i>	152	117	1092	363	38.46	6.24
<i>BpTCP7</i>	350	272	1044	347	38.73	6.85
<i>BpTCP8</i>	350	56	882	293	33.30	6.73
<i>BpTCP9</i>	238	104	1053	350	36.54	6.18
<i>BpTCP10</i>	580	943	813	270	27.89	9.51
<i>BpTCP11</i>	204	555	1014	337	36.13	9.79
<i>BpTCP12</i>	210	41	1200	399	44.13	7.65
<i>BpTCP13</i>	310	56	885	294	33.56	6.45
<i>BpTCP14</i>	1072	411	1545	514	56.54	6.93
<i>BpTCP15</i>	652	340	1263	420	45.29	6.50

1.1.3 *BpTCP* 基因氨基酸序列的同源性分析

对白桦 15 条 *BpTCP* 基因编码的氨基酸进行多序列比对分析, 结果显示, 15 条 *BpTCP* 基因的氨基酸序列都含有 TCP 保守结构域并编码结构相似的蛋白质, 其中由 59 个氨基酸组成的 bHLH 结构是结合 DNA 和蛋白互作所必需的。如图 1-1 所示, 在 110~170 这一区段的氨基酸序列是 TCP 保守结构域 (bHLH 结构域), bHLH 结构域由 50~60 个氨基酸组成, 包括: 长度为 10~15 个氨基酸的碱性氨基酸区和 40 个氨基酸左右的 α 螺旋-环- α 螺旋区 (HLH 区)。

图 1-1 白桦 *BpTCP* 蛋白保守域的序列比对 (彩图请扫封底二维码)

图中用红色标出的区域为碱性氨基酸区 (Basic), 橘色和蓝色区域均为 α 螺旋区 (helix), 绿色区域为环区 (loop), 蓝色、绿色、橘色区组成 α 螺旋-环- α 螺旋区 (HLH 区)